

В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрuba, О.Д. Присяжна

Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету І типу

Через 60 сут после одноразового введення стрептозотоцина (СТЦ) в дозе 5 мг/100 г в сердце и аорте крыс развивается оксидативный (активирование перекисного окисления липидов (ПОЛ)) и нитрозативный (активирование нитрозилирования белков) виды окислительного стресса, увеличивается генерация активных форм кислорода (АФК) (супероксидный анион (O_2^-), гидроксильный радикал (OH)) и пулы перекиси водорода (H_2O_2), уровни ПОЛ (маркер-диеновые конъюгаты). Основное значение в генерации O_2^- при действии СТЦ вносит ксантиноксидаза (маркер-мочевая кислота), тогда как вклад липидных оксидаз – липокси- и циклооксигеназ менее значителен (маркеры LTC_4 и TxB_2 соответственно). При этом в органах кардиоваскулярной системы увеличиваются пулы сфингозина и, наоборот, снижаются пулы полиаминов, что предполагает увеличение при действии СТЦ процесса деградации полиаминов аминоксидазами и генерации ими H_2O_2 , а также увеличение образования сфингозина. Экдистерон в дозе 100 нг/100 г в сутки per os в течение 2 мес минимизировал показатели оксидативного и нитрозативного стресса в сердце и аорте взрослых крыс и предотвращал развитие окислительного стресса в этих органах после введения животным СТЦ. При этом генерация АФК повышалась незначительно относительно контрольных животных, не получавших СТЦ, а пулы H_2O_2 даже достоверно снижались в сердце крыс, получавших экдистерон после введения СТЦ. Интенсивность генерации O_2^- ксантиноксидазой и оксидазами липидов оставалась на уровне контроля, ПОЛ незначительно повышались только в сердце, пулы сфингозина также повышались незначительно, тогда как содержание полиаминов, наоборот, увеличивалось почти в 2 раза относительно контроля в сердце и незначительно в аорте не достигая, однако, контрольных значений. Результаты корреляционного анализа показывают специфику развития оксидативного и нитрозативного стрессов при различных физиологических условиях в сердце и аорте. Предлагается новый механизм регуляции индуцибельных синтезов NO, простагландинов и кофактора NO-синтазы тетрагидробиоптерина экдистероном путем стимулирования ферментативной деградации фосфорилированного сфингозина (S-1-P), который является эффективным регулятором активности индуцибельной NOS, циклооксигеназы и ГТФ-циклогидролазы в органах сердечно-сосудистой системы: сфингомиелин > церамид > сфингозин > сфингозин-1-фосфат > фосфоэтаноламин.

ВСТУП

За останні роки накопичилося багато даних щодо тісної взаємодії продукції вільних радикалів кисню та оксиду азоту. У внутрішній мембрані мітохондрій локалізована мітохондріальна NO-синтаза NOS, яка продукує як оксид азоту за наявності

аргініну, так і супероксидний аніон-радикал (O_2^-) – за дефіциту аргініну або кофактора тетрагидробиоптерину (BH4). Відомо, що за відсутності екстремальних ендо- та екзогенних факторів концентрація продуктів неферментативного перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) підтримується на низькому рівні. В фізіологічних концентраціях ендо-

© В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрuba, О.Д. Присяжна

генні активні форми кисню (АФК) та ліпоперекиси беруть участь у синтезі низки речовин і виконують сигнальні функції [1]. При низьких концентраціях АФК і NO є фізіологічними модуляторами в мітохондріях, що регулюють споживання кисню, синтез АТФ і транспорт Ca^{2+} , але при їх накопиченні викликають порушення цих процесів внаслідок окисного стресу (оксидативного, залежного від АФК, та нітрозативного, що викликається активними формами азоту (АФА) – оксидом азоту (NO), N_2O_3 , пероксинітрит-аніоном ($ONOO^-$) і продуктом його деградації діоксидом азоту – NO_2). У більшості випадків пошкоджувальна дія NO є непрямою і опосередковується пероксинітритом, який утворюється при одночасній генерації високого рівнів як NO, так і супероксид-аніона через окиснення білків дихального ланцюга, пригнічуючи дихання мітохондрій і підвищуючи їх чутливість до індукторів відкриття мітохондріальної пори [15]. Крім того, високий вміст оксиду азоту пригнічує активність каталази, що призводить до збільшення вмісту H_2O_2 і кальційзалежних NOS, в тому числі мітохондріальної, що також призводить до утворення нею O_2^- замість NO [20].

При різних патологіях, у тому числі при інсулінзалежному цукровому діабеті, активність кальційзалежних NOS низька, але високу активність має кальційнезалежна індукбельна NOS, яка індукується запальними цитокінами – ФНП α , інтерлейкіном β , інтерфероном γ [22]. Активація конститутивних NOS (eNOS, pNOS) здійснюється транзитивно підвищенням внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i і конститутивно протеїнкіназою B (Akt/PKB), яка знаходиться під контролем інсулінової сигнальної системи (через активацію PI-3K) чи сфінгомелінового сигнального каскаду [9], що активується ФНП α та C_{27} -стероїдними гормонами – кальцитріолом (1,25 дигідроксिवітаміном D_3) або його природним структурним

аналогом – полігідроксильованим стероїдним гормоном екдистероном. Як було показано нами раніше, за фізіологічних умов екдистерон, подібно кальцитріолу, в догеномній мембранній фазі дії плеїотропно активує в клітинах різних органів (у тому числі в серці) низку сигнальних каскадів, що продукують утворення в клітинах таких вторинних посередників, як оксид азоту, сфінгозин, cGMP, простациклін, лейкотриєн C_4 тощо. Крім того, було встановлено, що фітогормон екдистерон в організмі тварин проявляє потужну антирадикальну та антиокисну дії [4, 5].

Враховуючи літературні дані про сигнальну та антиокисну дію екдистерону за фізіологічних умов та про порушення за умов цукрового діабету інсулінової сигналізації і значне посилення оксидативного та нітрозативного стресу, метою нашої роботи було дослідити особливості їхнього перебігу в умовах тривалого введення екдистерону дорослим тваринам і тваринам, яким вводили стрептозотонин для моделювання експериментального цукрового діабету I типу.

МЕТОДИКА

Показники, що характеризують окисний метаболізм кисню, визначали в гомогенатах серця й аорти щурів-самців з діабетом лінії Вістар–Киото віком 6 міс та масою 200–250 г, яким за 2 міс перед тим для розвитку експериментального цукрового діабету було введено внутрішньоочеревинно стрептозотонин (“Sigma”, США) з розрахунку 50 мг/кг. Для дослідів використовували чотири групи тварин: I група – інтактний контроль, II – здорові щури, яким вводили екдистерон, III – щури з діабетом (через 60 днів після введення стрептозотонину), IV – щури з діабетом, яким вводили екдистерон (з 1-ї доби після одноразового введення стрептозотонину та щоденно протягом 60 днів). Екдистерон в дозі 1 мкг/кг вводили перорально з питною

водою. Використовували розчин кристалічного екдистерону, виділеного методом екстракції та хроматографії із рослин *Serratula coronata* у відділі біохімії стеринів у Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України проф. Ю.Д. Холодовою. Контроль глюкози крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США).

У гомогенатах серця та аорти щурів за описаними методами [8, 17, 18] визначали вміст супероксидного радикала (O_2^-), швидкість генерації гідроксил-радикала ($\cdot\text{OH}$) та вміст пероксиду водню (H_2O_2). Інтенсивність неферментативного ПОЛ визначали за вмістом дієнових кон’югатів [2], а інтенсивність ферментативного окиснення ліпідів – за концентрацією окиснених продуктів вільної арахідонової кислоти – ейкозаноїдів лейкотриєну C_4 (LTC_4) та тромбоксану B_2 (TxB_2), використовуючи реактиви фірми «Amersham» (Англія). Вміст сечової кислоти визначали використовуючи реактиви фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст сфінгозину досліджували в ліпідних екстрактах проб колориметричним методом [3]. Вміст високо- і низькомолекулярних нітрозотіолів розраховували за методом Saville [13]. Вміст сумарних поліамінів (путресцин, спермін і спермідин) визначали флуориметрично [7].

Всі показники розраховували на міліграм білка тканин, який вивчали методом Бредфорд, використовуючи барвник *Cumassi G-250*. Коефіцієнти прямої (+ r) і оберненої (- r) кореляції між двома показниками) розраховували, використовуючи об’єднані експериментальні результати всіх досліджених груп тварин за описаним методом [6]. Таким чином, ми показали наявність прямої чи оберненої кореляції (змін біохімічного показника) незалежно від умов експерименту.

Результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи програмне забезпечення *Origin 6.0* фірми “Microcal Software, Inc”(США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Біохімічні показники, що характеризують інтенсивність окисного метаболізму за дії стрептозотоцину та екдистерону представлено в табл. 1 (серце) і табл. 2 (аорта). У контрольних дорослих щурів тривале введення екдистерону зумовлювало зниження окисного стресу в обох органах кардіоваскулярної системи, але не змінювало стаціонарні пули сфінгозину та поліамінів.

При дослідженні змін в окисному метаболізмі за тривалої гіперглікемії ми встановили, що в серці достовірно підвищується генерація O_2^- і $\cdot\text{OH}$ -радикала, тоді як вміст стабільного пероксиду водню (H_2O_2) не змінюється на відміну від його вмісту в аорті, який підвищується більш ніж утричі. Профілактичне введення екдистерону протягом усього періоду дії стрептозотоцину (60 діб) значно обмежує як рівні генерації нестабільних радикалів кисню в серці та аорті, так і нормалізує вміст стабільного H_2O_2 в аорті. Його вміст у серці щурів при введенні екдистерону став нижчим від контролю. Враховуючи важливість стабільного H_2O_2 в реалізації сигнальних ефектів багатьох вазоактивних сполук (як констрикторів, так і дилататорів), нормалізація його пулів за дії екдистерону вказує на причетність H_2O_2 в реалізації гіпоглікемічної дії екдистерону. Збільшення вмісту сечової кислоти та ейкозаноїдів (див. табл. 1, 2) за тривалої гіперглікемії в серці та аорті щурів свідчить про те, що надмірна генерація супероксиду в цих умовах, частково може зумовлюватися підвищенням активності ксантиноксидази, оксидаз ліпідів – ліпоксигенази та циклооксигенази. При введенні екдистерону спостерігали достовірне зниження пулів сечової кислоти і ейкозаноїдів, що вказує на можливу участь цих оксидаз у механізмах антирадикальної дії екдистерону (зниження рівнів генерації O_2^-) за тривалої гіперглікемії.

Таблиця 1. Дія екдистерону та стрептозотоцину на зміни біохімічних показників у серці щурів (M ± m; n = 10–15)

Показники	Контроль (I група)	Здорові щури, яким вводили екдистерон (II група)	Діабет (III група)	Діабет і введення екдистерону (IV група)
Нітрозотіоли, пмоль · мг білка				
Низькомолекулярні	69,68 ± 8,95	58,21 ± 7,64	71,15 ± 18,06	60,96 ± 6,81
Високомолекулярні	244,54 ± 34,57	125,3 ± 17,65*	1136,29 ± 406,00*	600,46 ± 74,38*
Сечова кислота, нмоль · мг	1,96 ± 0,24	1,02 ± 0,13	5,18 ± 0,45*	3,62 ± 0,33**
Сфінгозин, пмоль/мг	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,02	2,97 ± 0,18*	0,62 ± 0,12**
·O ₂ ⁻ , нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹	4,02 ± 0,97	2,45 ± 0,33*	11,32 ± 1,75*	7,38 ± 0,96**
H ₂ O ₂ , пмоль · мг	4,38 ± 0,50	2,85 ± 0,40*	3,68 ± 0,55	2,90 ± 0,46*
·ОН-радикал, ДЕ · хв ⁻¹ · мг ⁻¹	1,18 ± 0,22	0,67 ± 0,09	3,96 ± 0,87*	1,47 ± 0,09**
Дієнові кон'югати, нг · мг ⁻¹	3,26 ± 0,49	1,82 ± 0,23*	32,01 ± 1,71*	5,85 ± 0,71**
Поліаміни, нмоль · мг	63,20 ± 10,29	88,7 ± 9,42	42,78 ± 4,64	121,88 ± 6,41**
Лейкотриєн C ₄ , пмоль · мг	1,03 ± 0,12	0,67 ± 0,11*	8,67 ± 0,90*	1,28 ± 0,13**
Тромбоксан B ₂ , пмоль · мг	2,50 ± 0,22	2,04 ± 0,16	15,51 ± 0,88*	2,34 ± 0,37**

Примітка тут і в табл. 2: * зміни достовірні (P < 0,05) відносно контролю; ** відносно значень у тварин з діабетом.

Пригнічення підвищеної за тривалої гіперглікемії генерації ·ОН-радикала екдистероном у серці й аорті щурів може бути зумовлене, з одного боку, обмеженням утворення H₂O₂, з іншого – пригніченням його наступного перетворення (в реакціях Хабер–Вайса чи Фентона) у токсичний гідроксильний радикал за наявності іонів вільного заліза.

Важливість обмеження генерації супероксиду за дії екдистерону зумовлюється не лише наступним його перетворенням у ·ОН-радикал, що є ініціатором вільнорадикального окиснення білків, ліпідів і нуклеїнових кислот, але і утворенням пероксинітриду (ONOO⁻) при взаємодії з оксидом азоту. Активація процесу ПОЛ в органах кардіоваскулярної системи за хронічної гіперглікемії підтверджується значним збільшенням вмісту дієнових кон'югатів (майже у 10 разів у серці і більш ніж утричі в аорті). Таке парадоксально значне підвищення ПОЛ у серці за досить незначної генерації ·ОН-радикала вказує на

наявність ще одного ініціатора цього процесу, а саме радикала ·NO₂, який може утворюватися при розпаді ONOO⁻. У такому разі пригнічення ПОЛ за дії екдистерону в серці щурів більшою мірою, ніж в аорті може бути зумовлене обмеженням утворення як ·ОН-радикала, так і ·NO₂ (внаслідок пригнічення генерації ·O₂⁻ і утворення ONOO⁻ та його наступної деградації).

Цікавим є факт значного інгібування лише у разі дії стрептозотоцину, але не за профілактичного введення екдистерону, утворення маркерів нітрозативного стресу, якими є нітрозильовані низькомолекулярні (в основному нітрозоглутатіон, НМНТ) і високомолекулярні (білкові, ВМНТ) нітрозотіоли в аорті щурів, але не в серці, де вміст НМНТ був стабільним за всіх умов експерименту, а вміст ВМНТ не знижувався, як це спостерігалось в аорті, а, навпаки, зростав більше ніж у 4 рази. Такі відмінності в дії стрептозотоцину та екдистерону в серці й аорті щурів вказують

Таблиця 2. Біохімічні показники у аорті щурів за дії екдистерону та стрептозотоцину ($M \pm m$; $n = 10-15$)

Показники	Контроль (I група)	Здорові щури, яким вводили екдистерон (II група)	Діабет (III група)	Діабет і введення екдистерону (IV група)
Нітрозотіоли, пмоль · мг білка				
Низькомолекулярні	513,31 ± 71,92	282,2 ± 19,5*	150,96 ± 27,57*	648,06 ± 96,38**
Високомолекулярні	3031,86 ± 481,32	2073,1 ± 114,9	566,12 ± 117,85*	4429,8 ± 178,40***
Сечова кислота, нмоль · мг	5,50 ± 0,64	0,36 ± 0,05*	14,92 ± 1,87*	5,15 ± 0,73**
Сфінгозин, пмоль/мг	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,03	1,82 ± 0,15*	0,54 ± 0,08***
·O ₂ ⁻ , нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹	4,68 ± 1,37	1,59 ± 0,18*	20,97 ± 1,97*	9,36 ± 0,23*,**
H ₂ O ₂ , пмоль · мг	47,13 ± 7,52	21,54 ± 3,50*	159,35 ± 22,57*	56,94 ± 6,58**
·ОН-радикал, ΔE · хв ⁻¹ · мг ⁻¹	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,03	3,92 ± 0,51*	1,33 ± 0,15***
Дієнові кон'югати, нг · мг ⁻¹	7,42 ± 0,94	4,51 ± 0,62*	24,77 ± 3,56*	9,01 ± 1,10**
Поліаміни, нмоль · мг	349,97 ± 30,26	375,8 ± 42,7	175,97 ± 29,32	226,34 ± 32,18***
Лейкотриєн C ₄ , пмоль · мг	7,45 ± 0,33	3,15 ± 0,22*	12,41 ± 2,62	6,06 ± 1,52**
Тромбоксан B ₂ , пмоль · мг	10,44 ± 0,88	4,12 ± 0,36*	18,09 ± 1,75*	6,26 ± 1,28*,**

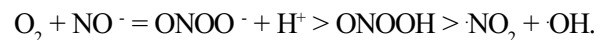
на специфіку розвитку оксидативного і нітрозативного видів стресу в умовах тривалої гіперглікемії, що відображає специфіку утворення супероксиду і його ферментативне перетворення в H₂O₂ при дії супероксиддисмутази (більш значне в аорті, але не в серці, де вміст H₂O₂ не змінювався за дії стрептозотоцину). Крім того, певне значення може мати утворення пероксинітриту при взаємодії супероксиду з оксидом азоту та ступінь деградації пероксинітриту з утворенням двох токсичних радикалів, що викликають як оксидативний стрес (маркером якого є ПОЛ, на що ми вказували раніше), так і нітрозативний стрес, маркером якого і є нітрозотіоли. Отже, наші результати вперше вказують на відмінності (специфічність) у проявах цих двох типів пошкоджувального окиснювального метаболізму в різних органах кардіоваскулярної системи: якщо в серці реалізуються оксидативний і нітрозативний стреси, то в аорті – в основному, оксидативний. Причини такої відмінності полягають швидше за все в компартменталізації місць і способів генерації супероксиду та оксиду азоту в цих

органах. Проведений кореляційний аналіз показав незначні відмінності внеску генерованого різними оксидазами O₂⁻ в органах серцево-судинної системи. В серці й аорті O₂⁻ генерується дослідженими нами оксидазами в такій послідовності: ксантиноксидаза > ліпідоксидаза > циклооксигеназа, про що свідчать коефіцієнти кореляції між інтенсивністю генерації супероксиду і вмістом відповідно сечової кислоти (маркер ксантиноксидази, $r = + 0,998$ у серці і $r = + 0,951$ в аорті), LTC₄ (маркер ліпооксигенази, $r = + 0,901$ в серці і $r = + 0,881$ в аорті) і TxV₂ (маркер циклооксигенази, $r = + 0,883$ в серці і $r = + 0,803$ в аорті).

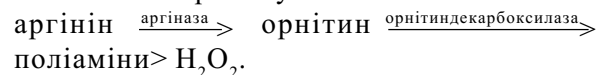
Цікавими є також взаємозалежні зміни вмісту в серці та аорті поліамінів і H₂O₂. Останній може утворюватися при деградації поліамінів різними оксидазами незалежним від дисмутації супероксиду. Поліаміни утворюються при неокисному метаболізмі аргініну (L-аргінін + H₂O > сечовина + орнітин > поліаміни > H₂O₂). Цей шлях конкурує з окисним метаболізмом аргініну (L-аргінін + O₂ > NO + цитрулін). Поліаміни проявляють антирадикальні

властивості, що підтверджується і нашими результатами – підвищення вмісту поліамінів супроводжується зниженням інтенсивності генерації $\cdot\text{O}_2^-$ ($r = -0,736$), контролюють синтез ДНК, NO і транспорт кальцію в мітохондрії, а також так званий «кальцієвий рецептор» плазматичних мембран клітин [20]. За хронічної гіперглікемії пули поліамінів у серці не змінюються (див. табл. 1), а в аорті зменшуються (див. табл. 2), що негативно корелює зі змінами вмісту H_2O_2 в цих органах. Останнє свідчить про значний внесок H_2O_2 , який утворився при деградації поліамінів, у наповнення існуючих стаціонарних його пулів в органах кардіоваскулярної системи за норми і патології. Цей взаємозв'язок підтверджується також результатами про профілактичну дію екдистерону. Так, у серці шурів через 60 діб щоденного введення екдистерону після одноразового, в першу добу досліджу, введення стрептозотоцину вміст поліамінів підвищується тоді, як вміст H_2O_2 знижується вдвічі порівняно з контрольними значеннями. В аорті при введенні екдистерону вміст поліамінів достовірно підвищується щодо такого при діабеті паралельно із значним зниженням вмісту H_2O_2 . Ці результати вказують на тісний зв'язок між пулами поліамінів і продукту їх деградації – H_2O_2 в органах серцево-судинної системи. Кореляційний аналіз показав наявність значних відмінностей у джерелах утворення стаціонарних пулів H_2O_2 в органах кардіоваскулярної системи. В серці вміст H_2O_2 формується внаслідок як деградації поліамінів (між вмістом H_2O_2 і поліамінів $r = -0,736$), так і дисмутації супероксиду (між вмістом H_2O_2 і $\cdot\text{O}_2^-$ $r = -0,432$). В аорті вміст H_2O_2 формується переважно внаслідок деградації поліамінів ($r = -0,776$ між вмістом H_2O_2 і поліамінів $r = +0,979$ між вмістом H_2O_2 і $\cdot\text{O}_2^-$). Більше того, позитивна кореляція між змінами вмісту H_2O_2 і супероксиду передбачає, що пули цих АФК формуються хоч і взаємо-

залежно, але з різних джерел. Відсутність будь-якої (позитивної чи негативної) кореляції між пулами H_2O_2 і швидкістю утворення $\cdot\text{OH}$ ($r = -0,064$) вказує на те, що, можливо, основним шляхом генерації $\cdot\text{OH}$ у серці шурів за різних фізіологічних умов (в нормі і при патології) може бути не лише його утворення із H_2O_2 в реакціях Фентона чи Хабер–Вайса, а і за наявності підвищеної генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і NO – внаслідок утворення та деградації пероксинітриду: $\cdot\text{O}_2^- + \text{NO} > \text{ONOO}^- + \text{H}^+ > \text{ONOOH} > \text{NO}_2 + \cdot\text{OH}$, причому АФК (H_2O_2 і $\cdot\text{OH}$) в серці шурів утворюються взаємозалежно. Цікаво, що $\cdot\text{OH}$ може генеруватися навіть і без окисного стресу, а лише за нітрозативного стресу, що ініціюється підвищенням генерації NO (при запаленні й індукції iNOS і індукцйбельного синтезу оксиду азоту, чи при гіпоксії та активації редуцтазного шляху синтезу оксиду азоту), а саме при взаємодії іонів NO^- з киснем:



Зовсім інша взаємодія між пулами H_2O_2 та швидкістю генерації $\cdot\text{OH}$ в аорті шурів за різних фізіологічних станів ($r = +0,981$) передбачає взаємозалежне утворення цих двох АФК, але також враховуючи, що кореляція позитивна, свідчить про превалювання нітрозативного шляху (через утворення і розпад пероксинітриду) утворення $\cdot\text{OH}$. Водночас на відміну від серця, в аорті надмірне утворення $\cdot\text{OH}$ (а, отже, і пероксинітриду) прямо корелює з підвищенням вмісту H_2O_2 , що може спостерігатися, наприклад при деградації поліамінів, які утворюються при аргіназному метаболізмі аргініну:



Наявність такої сильної позитивної кореляції вказує на те, що аргіназа не лише не конкурує з індукцйбельною NOS (тільки вона здатна продукувати високий вміст NO, необхідний для утворення пероксинітриду та його деградації з утворенням

ОН) за спільний субстрат – аргінін (конкурують лише конститутивні NOS), а і, швидше за все, сама аргіназа і весь шлях утворення поліамінів (а, отже, і H_2O_2 при їх деградації) активується при підвищенні пулів H_2O_2 в аорті. Можливість такої активації аргінази H_2O_2 , причому саме в аорті, підтверджується даними літератури [19].

Іншими важливими продуктами деградації поліамінів, крім токсичних альдегідів і H_2O_2 є низькомолекулярні сполуки з дуже важливими регуляторними властивостями – потужний антиоксидант β -аланін та γ -аміномасляна кислота (ГАМК), яка має регуляторні властивості в органах кардіо-васкулярної системи, в тому числі контролює мітохондріальну пору [12].

Екдистерон, що вводився протягом 60 діб з першого дня після введення стрептозоточину, запобігає розвитку окисного стресу (див. табл. 1, 2). Про пригнічення оксидативного стресу свідчить зниження вмісту дієнових кан'югатів і ферментативного окиснення вільної арахідонової кислоти. Останнє передбачає можливість дії екдистерону на цілісність мембран, можливо, внаслідок пригнічення гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою A2 і генерації O_2^- в процесі окиснення вільної арахідонової кислоти, що звільняється за її дії, оксидазами ліпідів. Не виключено пригнічення екдистероном і самих оксидаз.

Слід відмітити, що вміст сфінгозину значно збільшується в серці й аорті тварин за умов цукрового діабету, але за тривалої дії екдистерону в цих органах підвищується значно меншою мірою (див. табл. 1, 2). Раніше ми показали, що екдистерон (10^{-8} моль/л), введений одноразово викликає в серці і головному мозку щурів негайний транзиторний гідроліз сфінгом'єліну (SM>церамід> сфінгозин), а також викликає короткочасне збільшення *de novo* синтезу сфінгозину [5]. Хронічне (протягом 2 міс) введення екдистерону супроводжується незначним підвищенням вмісту сфінгозину.

Це може бути викликано збільшенням фосфорилування сфінгозину специфічною сфінгозин-1-кіназою з утворенням важливого біорегулятора сфінгозин-1-фосфату (S-I-P), що є активатором протеїнкінази B (Akt/PKB), яка інсулінзалежно активує конститутивний синтез оксиду азоту ферментом ендотеліальною NOS. Відомо, що високі концентрації сфінгозину чинять проапоптотичну дію внаслідок пригнічення протеїнкінази C. У такому разі більш виражене пригнічення екдистероном утворення високої внутрішньоклітинної концентрації сфінгозину в серці щурів порівняно з таким в аорті може відігравати важливу роль у реалізації більш вираженої кардіоніж вазо-протекторної дії екдистерону за хронічної гіперглікемії. Нещодавно стало відомо, що за аналогією з поліамінами, коли утворюються важливі вазо- і кардіорегулятори при їх деградації (ГАМК, β -аланін, H_2O_2), при деградації сфінгозин-1-фосфату також утворюються як токсичний альдегід (гексадеценал), так і фосфоетаноламін [11], що може дефосфорилуватися в етаноламін. Отже, значне та достовірне зниження екдистероном пулів сфінгозину в серці й аорті щурів може вказувати на підвищення його деградації ферментом S-I-P-ліазою за схемою: SM>церамід > сфінгозин > S-I-P > фосфоетаноламін > етаноламін. Функції синтезованих у такий спосіб фосфоетаноламіну й етаноламіну невідомі. Вони можуть проявляти фізіологічні вазо- і кардіорегуляторні властивості, подібно до того фосфоетаноламіну, який утворюється при гідролізі мембранного фосфоліпиду фосфатидилетаноламіну фосфоліпазою C чи етаноламіну, що утворюється при розладі фосфатидилетаноламіну фосфоліпазою D, а також при застосуванні препаратів N-ацилетаноламінів [16].

Кореляційний аналіз показав наявність достовірного позитивного зв'язку між змінами пулів сфінгозину та нітрозотіолів,

що також передбачає можливість участі продуктів утворених при деградації сфінгозину в розвитку нітрозативного стресу в серці, але не в аорті щурів ($r = +0,502$ для пари НМНТ – сфінгозин і $r = +0,962$ для пари ВМНТ – сфінгозин, тоді як в аорті кореляція була оберненою ($r = -0,916$ і $r = -0,871$ відповідно). Коефіцієнт кореляції між змінами вмісту сфінгозину та ВМНТ в серці щурів прямий ($r = +0,963$), тоді як в аорті – обернений ($r = -0,871$), що передбачає можливість участі генерованого в цьому шляху оксиду азоту в нітрозилуванні білків. Цей процес може відігравати не лише пошкоджувальну роль (нітрозативний стрес), але також і регуляторну внаслідок нітрозилування/денітрозилування білків, аналогічно їх фосфорилуванню /дефосфорилуванню.

Після введення стрептозотоцину гормональні дози екдистерону запобігають розвитку гіперглікемії, оксидативного і нітрозативного стресу в серці й аорті щурів. Основним біохімічним механізмом цієї дії може бути зниження рівнів генерації супероксиду ксантиноксидазою і обома оксидазами ліпідів, що зумовлює зниження утворення пероксинітриду та продуктів його розпаду – ініціаторів ПОЛ, і нітрозативного стресу $\cdot\text{NO}_2$ та $\cdot\text{OH}$. Внаслідок зниження рівнів генерації цих ініціаторів екдистерон інгібує також сам процес ПОЛ. Наслідком пригнічення утворення $\cdot\text{O}_2^-$ екдистероном є обмеження утворення H_2O_2 через дисмутацію супероксиду супероксиддисмутазою. Екдистерон обмежує утворення H_2O_2 також внаслідок деградації поліамінів різними аміноксидазами, пригнічуючи утворення поліамінів та аргіназний метаболізм аргініну. Екдистерон активує не лише гідроліз сфінгомієліну й утворення продуктів цього гідролізу – кераміду та сфінгозину, але і наступну деградацію сфінгозину, за якої можуть утворюватися вазо- і кардіоактивні метаболіти – фосфоетаноламін та етаноламін.

ВИСНОВКИ

1. В органах кардіоваскулярної системи за тривалої гіперглікемії, викликаній введенням стрептозотоцину, розвиваються два взаємозалежних види окисного стресу – оксидативний (викликаний АФК) і нітрозативний (викликаний як АФА – оксидом і діоксидом, так і гідроксильним радикалом). Нітрозативний стрес (нітрозилування білків) більшою мірою проявляється в тканинах серця, а оксидативний (ПОЛ) – в аорті щурів.

2. Одночасне із стрептозотоцином введення екдистерону пригнічує як утворення АФК та АФА, так і інтенсивність процесу ПОЛ у серці та аорті тварин, тобто призводить до вираженої антирадикальної та антиокисної дії.

3. Гіпоглікемічна дія екдистерону супроводжується як пригніченням синтезу оксиду азоту внаслідок реутилізації нітрит- і нітрат-аніонів відповідними редуктазами, а також індукцією ізоформою NOS (iNOS), так і нормалізацією кальційзалежних конститутивних NOS (eNOS, nNOS).

V.F. Sagach, Yu.P. Korkach, A.V. Kotsuruba, O.D. Prisyazhna

THE INHIBITION OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESSES BY ECDYSTERONE AS THE MECHANISMS OF ITS CARDIO- AND VASOPROTECTIVE ACTION AT TYPE I DIABETES

Streptozotocine (STZ) administration (5mg/100g) up regulates oxidative (lipid peroxidation as a marker) and nitrosative (protein nitrosilation as a marker) stresses as well as ROS (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) generation in heart and aorta in rats after 60 days of STZ action. The level of oxydative stress was higher in aorta. Xanthine oxidase (XO) activation (uric acid as marker), but not lipoxygenase (LTC_4 as marker) or cyclooxygenase (TxB_2 as marker) are the main oxydases that generate $\cdot\text{O}_2^-$ as calculated by correlation analysis. STZ administration led to sphingosine pools up regulation in heart and aorta, but pools of polyamines in this organ was down regulated. C_{27} -phytosteroid hormone ecdysterone (100ng/100g, per os, 60 days) mimics the action of its structural analog C_{27} -steroid hormone calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3) and protects rise of ROS generation (by XO inhibition), lipid peroxidation, protein nitrosilation, polyamine degradation in heart and aorta of rats after STZ administration. The new mechanism of iNOS activation, prostaglandine and tetrahydrobiopterin synthesis

stimulation by ecdysterone has been proposed. It was due to stimulating enzymatic degradation of sphingosine-1-phosphate as effective regulator of iNOS, COX and GTP-cyclohydrolase in cardio-vascular system: sphingomyelin > ceramide > sphingosine > S-I-P > phosphoethanolamine > ethanolamine.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine;

O.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. – СПб.: Наука, 1992. – 148 с.
2. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара И.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С.60–64.
3. Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
4. Коцюрuba А.В., Буханевич О.М., Туганова А.В., Тараканов С.С. Механізми ранньої дії біологічно активних оксистеринів: кальцитріолу та ектистерону. Модуляція внутрішньоклітинних пулів арахідонової кислоти та продуктів її окиснювального метаболізму // Укр. біохім. журн. – 1995. – **67**, №2. – С. 49–52.
5. Коцюрuba А.В., Туганова А.В., Буханевич О.М., Тараканов С.С. Механізми ранньої дії біологічно – активних оксистеринів: кальцитріолу та ектистерону. Ідентифікація обміну сфінгомеліну як ефекторного механізму ранньої дії // Там само. – С. 52–58.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
7. Сяткин С.П., Березов Т.Т. Микрометод флюориметрического определения содержания полиаминов и путресцина в тканях животных тонкослойной хроматографией на пластинках силуфола UV – 254 // Вопр. мед химии. – 1981. – № 6. – С. 848–851.
8. Conte D.S., Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №9. – P.5125–5130.
9. di Villa Bianca R., Sorrentino R., Imbimbo C. et al. Sphingosine 1-phosphate induces endothelial nitric – oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum // J. Pharmacol. Exp. Therap. – 2006. – **316**, №2. – P. 703–708.
10. Ellis A., Triggle C.R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone // Can J. Physiol.

Pharmacol. – 2003. – **81**, №11. – P. 1013–1028.

11. Ikeda M., Kihara A., Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – **325**, №1. – P.338–343.
12. Gesi M., Riva A., Soldani P. et al. Central and peripheral benzodiazepine ligands prevent mitochondrial damage induced by noise exposure in the rat myocardium: an ultrastructural study // Anat Rec. – 1999. – **255**, №3. – P. 334–341.
13. Gerdel D., Cederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc // Biochemistry. – 1996. – **35**, № 50. – P.16186–16194.
14. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism // Biochem. J. – 1998. – **332**. – P. 673–679.
15. Giulivi C., Boveris A., Cadenas E. The steady state concentration of oxygen radicals in mitochondria. – Reactive Oxygen Species in Biological System. – New York, 1999. – P. 77–101.
16. Hula N.M., Kosiakova H.V., Berdyshev A.H. The effects of n-stearoylethanolamine on the NO-synthase pathway of NO generation in the aorta and heart of streptozotocin-induced diabetic rats // Ukr. Biokhim. Zn. – 2007. – **79**, №5. – P.153–158.
17. Humphries K.M., Yoo Y., Szweda L.I. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal // Biochemistry. – 1998. – **37**, №2. – P. 552–557.
18. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // Biochem. J. – 1982. – **203**, №3. – P.551–558.
19. Narus Thengchaisri, Travis W.H., Wei Wang, Xin Xu. et al. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles // Arterioscler. Thromb. Vascular. Biol. – 2006. – № 26. – P. 2035–2042.
20. Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – **11**, №4. – P.685–703.
21. Richter Ch., Gogvadze V., Laffranchi R., Schlapbach R. Oxidants in Mitochondria: from Physiology to Diseases // Biochem. and Biophys. Acta. – 1995. – **1271**. – P. 67–74.
22. Thomas S.R., Chen K., Keaney J.F. Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №8. – P.6017–6024.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: ruba@biochem.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 06.05.2008*